

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Biokompatibilitas merupakan salah satu syarat yang perlu diperhatikan dalam pengembangan biomaterial, terutama jika digunakan sebagai implan dalam tubuh manusia. Biokompatibel bukanlah sifat yang terdapat di dalam suatu material, namun lebih kepada bagaimana respon lingkungan atau area sekitar material dalam mentolerir keberadaannya dan berinteraksi dengan material tersebut (Asti dan Gioglio, 2014). Beberapa jenis material logam telah digunakan dan dikembangkan, seperti Cobalt-Chromium (Co-Cr) dan Stainless Steel (SS), namun diketahui memiliki sifat toksik dan menimbulkan alergi (Yang *et al.*, 2012; Bobyn *et al.*, 2014). Jenis titanium murni (CpTi) pun telah digunakan dalam dunia medis karena memiliki resistensi korosi yang baik, namun masih memiliki beberapa kelemahan seperti karakteristik permukaan yang kurang baik sehingga menginduksi sitokin IL-1 dan IL-6 dalam pemakaiannya (Alfarsi *et al.*, 2013).

Untuk menutupi kekurangan dari titanium murni, kemudian para ahli mengembangkan beberapa paduan titanium, yaitu paduan tipe $\alpha+\beta$ seperti Ti6Al4V yang diketahui memiliki nilai modulus elastisitas yang tinggi (110 GPa) dibandingkan dengan tulang kortikal manusia (30 GPa) (Niinomi, 2003; Sista *et al.*, 2011). Ketidakcocokan nilai modulus ini mengakibatkan terjadinya *stress shielding* yang memicu resorpsi tulang sehingga terjadi kelonggaran dan kegagalan implantasi dini (Huiskes *et al.*, 1992). Disisi lain, pelepasan senyawa dari Ti6Al4V yang berpotensi berbahaya, yaitu Al dan V dapat menjadi toksik bagi tubuh manusia (Hallab *et al.*, 2001). Kemudian peneliti mengembangkan titanium paduan tipe β yang dianggap mampu memenuhi semua persyaratan yang diperlukan dimana bahan paduan yang

digunakan merupakan elemen yang stabil, seperti molybdenum, silicon, niobium, zirconium, dan tantalum (Niinomi, 2008).

Beberapa paduan titanium telah dikembangkan dengan mengacu pada nilai modulus elastisitas yang mendekati tulang, seperti Ti₂₉Nb₁₃Ta_{4,6} Zr (TNTZ) (Niinomi, 2003), Ti₂₅Ta₂₅Nb (Bertrand *et al.*, 2010), dan Ti₃₅Nb₄Sn (Jung *et al.*, 2010) dengan nilai modulus masing-masing sekitar 65 GPa, 55 GPa, dan 40 GPa. Nilai modulus elastisitas semua paduan ini hampir mendekati nilai modulus elastisitas tulang asli. Selain itu, juga ada TNTZ yang merupakan jenis titanium paduan tipe β dengan nilai modulus elastisitas hampir mendekati modulus elastisitas tulang, yaitu sekitar 65 Gpa. Paduan TNTZ ini diharapkan dapat menurunkan resiko *stress shielding* ketika diaplikasikan dalam dunia medis terutama digunakan sebagai prostesis.

Elemen material titanium jenis TNTZ terdiri dari Titanium, Niobium, Tantalum, dan Zirconium yang masuk kedalam kelompok elemen stabil. Penelitian lainnya menyebutkan bahwa elemen Niobium (Hamdy *et al.*, 2006) dapat meningkatkan daya tahan korosi material. Elemen Tantalum (Ta) memiliki daya tahan korosi karena memiliki stabilitas oksidasi yang tinggi (Robin dan Rosa, 2000; Sherepo dan Red'ko, 2004). Elemen Zirconium (Zr) dilaporkan memiliki kekuatan mekanis yang dapat diterima oleh *host* secara *in vivo* (Yang *et al.*, 2011) dan penelitian secara *in vivo* lainnya menunjukkan bahwa implan Zirconium menampilkan osseointegrasi yang bagus (Gahlert *et al.*, 2009). Hasil dari beberapa penelitian di atas menunjukkan bahwa semua elemen paduan material TNTZ memiliki sifat mekanis dan biologis yang bagus untuk digunakan sebagai biomaterial.

Bagaimanapun, TNTZ adalah material logam yang bersifat *inert* (non bioaktif) dan tetap dianggap benda asing oleh tubuh. Salah satu metoda yang bisa digunakan untuk membuat material logam lebih bersifat bioaktif dan tidak dianggap benda asing

adalah dengan melakukan pelapisan pada logam dengan biomaterial yang merupakan komponen penyusun tubuh manusia (Bobyin *et al.*, 2014). Beberapa metode pelapisan termasuk jenis biomaterial untuk pelapis telah dikembangkan. Pelapisan dengan biomaterial berbahan keramik diketahui mampu meningkatkan terjadinya adhesi sel dan proses osteogenesis (Li *et al.*, 2009). Pelapisan dengan komponen organik tulang juga dapat menjadi solusi, seperti matriks ekstraselular. Komponen organik matriks ekstraselular (ECM) tulang salah satunya adalah kolagen tipe 1 yang berbentuk fibril, bersifat *amorph*, dan terdiri dari *glycosaminoglycans* dan berbagai protein lainnya (Fratzl, 2008; Morra *et al.*, 2010).

Singkatnya, kolagen tipe 1 yang merupakan protein struktural utama ECM dapat digunakan sebagai material pelapis implan organik. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa pelapisan kolagen berperan penting dalam menstimulasi respon sel, meningkatkan pertumbuhan sel, dan meningkatkan aktivitas *bone-to-implant contact* (BIC) (Schliephake *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2016). Hal ini menunjukkan bahwa kolagen merupakan salah satu alternatif biomaterial pelapis yang dapat digunakan untuk mengatasi sifat inert suatu logam.

Material yang telah terlapis dan bersifat bioaktif perlu dilakukan pengujian, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Pengujian secara *in vitro* meskipun terbatas pada satu kasus/mekanisme, namun dapat menunjukkan hasil lebih cepat dan spesifik sehingga pada penelitian ini pun akan dilakukan pengujian secara *in vitro*. Untuk mengetahui pengaruh material titanium jenis TNTZ yang dilapisi kolagen terhadap mekanisme osteoblastis, dapat diuji menggunakan *cell line* seperti *mouse osteoblast cell line* (MC3T3-E1) (Sista *et al.*, 2011), sel primer *primary rat calvarial osteoblast cell line* (Zhao *et al.*, 2010), maupun sel *human MSC* (*Mesenchymal Stem Cell*) (Haleem-Smith *et al.*, 2012; Antonini *et al.*, 2017).

Selain itu juga dapat menggunakan *Wharton's Jelly Stem Cell* (WJ-MSC), merupakan jenis MSC yang bersumber dari *Wharton Jelly Umbilical Cord* (Houghton *et al.*, 2004). Sel ini lebih bersifat primitif dibandingkan dengan jenis MSC lainnya dan lebih mudah untuk diperoleh tanpa mengurus permasalahan kode etik (Mimeault dan Batra, 2006). Kelebihan dari sel ini adalah menjadi salah satu kandidat dalam regenerasi jaringan termasuk regenerasi tulang, memiliki potensi proliferasi yang tinggi, dan bersifat immunosupresif dibandingkan sel SC dewasa lainnya (Meng *et al.*, 2015) serta dilaporkan memiliki kapasitas diferensiasi osteogenik lebih tinggi dibandingkan BM-MSC (*Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells*) (Gamie *et al.*, 2012; Hua *et al.*, 2014). Selain itu, sel punca dari *umbilical cord* (WJ-MSC) ini juga dapat diinduksi menjadi sel endotelial, adipogenik, kondrogenik, maupun neurogenik (Chen *et al.*, 2009).

Kombinasi material jenis titanium yang memiliki potensi untuk diferensiasi osteogenik sel MSC dan diiringi dengan pemberian medium yang bersifat osteogenik akan membantu memperlihatkan profil mekanisme regenerasi tulang (Datta *et al.*, 2006). Pada dasarnya, diferensiasi MSC dipengaruhi oleh kondisi lingkungan mikro, seperti siklus tekanan mekanis yang terjadi pada sel (Simmons *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2015) maupun sifat biomaterial itu sendiri yang inheren (seperti, integritas material, kristanilitas, kepadatan, dan porositas secara makro maupun mikro). Salah satu penelitian mengenai pengaruh sifat biomaterial terhadap diferensiasi sel telah dilakukan oleh Liu *et al.* (2006) yang menemukan bahwa level pembentukan mineralisasi osteoblas antara *scaffold* tanpa pelapis dengan *scaffold* dilapisi ECM memiliki hasil berbeda. Hasil menunjukkan adanya efek sinergistik dari stimulasi mekanis (gaya gesek) ECM pada substrat *scaffold* yang menyebabkan terjadinya peningkatan kemampuan diferensiasi osteoblastik.

Penelitian pengaruh keberadaan titanium terhadap proses osteogenesis sel MSC telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya terutama yang berhubungan dengan struktur permukaan titanium. Antonini *et al.* (2017) meneliti pengaruh kekasaran permukaan yang berbeda pada titanium (Ti6Al4V) terhadap proses diferensiasi osteogenik sel *human embryonic stem cell* (hESC-MP) dengan permukaan titanium diberi perlakuan *mechanical polishing* dan *electropolishing*. Penanaman titanium kedalam sel bermedium osteogenik memberi pengaruh terhadap proses osteogenesis sel termasuk aktivitas alkalin posfat sel. Berdasarkan hasil yang diperoleh, dinyatakan bahwa kekasaran tingkat mikro pada permukaan material memiliki pengaruh terhadap proses osteogenesis sel (Antonini *et al.*, 2017). Penelitian lain juga menyatakan bahwa tidak hanya kekasaran mikro, tetapi juga topografi permukaan yang bersifat nano juga mampu menstimulasi diferensiasi *stem cell* meskipun tanpa keberadaan suplemen osteogenik (Polini *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2014).

Berdasarkan hasil penelitian diatas, dapat dinyatakan bahwa diferensiasi osteoblas dari *preosteoblastic Mesenchymal Stem Cells* (MSC) diinduksi oleh beberapa faktor seperti, topografi permukaan berstruktur nano, topografi berstruktur mikro dan juga sifat atau komposisi medium kultur (Gittens, *et al* 2012). Sifat permukaan material menentukan takdir sel punca dan proses penginduksian diferensiasi osteoblas. Jika dibandingkan dengan biomaterial lainnya seperti jaringan dikultur pada permukaan *polystyrene*, substrat titanium lebih memunculkan fenotipe diferensiasi osteoblas saat dikultur dalam medium berisi sel osteoblas dibanding *polystyrene* (Olivares-navarrete *et al.*, 2010).

Proses diferensiasi MSC menjadi osteoblas terjadi melalui beberapa jalur persinyalan seperti TGF- β /BMP, Notch, Wnt/ β -catenin, Hedgehog, dan MAPK (Gao *et al.*, 2017). Berdasarkan mekanisme biologis, diketahui bahwa jalur TGF- β /BMP dan

Wnt adalah pemicu awal dan utama untuk interaksi antara sel osteoprogenitor dengan permukaan implan (Chakravorty *et al.*, 2012). Pada jalur TGF- β /BMP, terdapat BMP-2, BMP-4, BMP-5 dan BMP-7 yang secara efektif memicu diferensiasi BMSC (*Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell*) menjadi osteoblas, dan BMP-2 menunjukkan aktivitas terkuat dibanding yang lainnya. Reseptor BMP pada membran sel akan mengikat jenis-jenis BMP tersebut. Bahkan pada beberapa aplikasi, BMP-2 berperan penting sebagai ko-faktor untuk mendukung regenerasi tulang pada berbagai jenis *scaffold*. BMP-2 yang ditanam pada implan kalsium posfat menunjukkan kemampuan untuk meningkatkan rasio volume jaringan tulang pada penelitian secara *in vivo*, dibanding tanpa BMP-2 (Paul *et al.*, 2016).

Pada jalur Wnt, protein Wnt terbagi menjadi protein Wnt klasik dan Wnt non-klasik. Diketahui bahwa Wnt5a (non-klasik) dan Wnt3a (klasik) juga terlibat dalam proses diferensiasi osteoblas, dimana Wnt3a mengaktivasi β -catenin melalui reseptor (Fzd/LRP) dan Wnt5a mengaktivasi protein G heteromerik dan meregulasi kadar ion Ca intraselular (Gao *et al.*, 2017). Akumulasi β -catenin selanjutnya memasuki nukleus dan berinteraksi dengan faktor transkripsi sel T dan faktor *enhancer* limfoid mengikat ke *promoter RUNX2* dan *Osx* (Osterix) (Yuan *et al.*, 2016).

Micro-RNA (miRNA) diketahui juga mempengaruhi pola ekspresi gen melalui represi translasi dan *silencing* gen (Bartel, 2009) serta merupakan regulator penting dalam proses diferensiasi (Shivdasani, 2006), termasuk diferensiasi osteoblas. Beberapa miRNA yang terlibat dalam proses peningkatan diferensiasi osteoblas, diantaranya miR-26a yang mengaktivasi kofaktor GSK-3 β (Su *et al.*, 2015) dan Tob1 (Li *et al.*, 2015), miR-194 mengaktivasi COUP-TFII (Jeong *et al.*, 2014), miR-216a mengaktivasi c-Cbl (Li *et al.*, 2015), dan miR-21 yang mampu mendorong terjadinya diferensiasi osteogenik pada MSC melalui jalur PI3K/ β -catenin dengan mengaktivasi

GSK-3 β (Meng *et al.*, 2015). Proses transfeksi microRNA-21 pada sel MSC ternyata dapat mempercepat proses osteogenik sel melalui jalur PI3K/ β -catenin yang dibuktikan dengan peningkatan kadar *ALP*, *RunX2*, dan *OCN*. Ekspresi miRNA-21 meningkat setelah 2 hari pertama inkubasi dalam medium osteogenik dan mengalami peningkatan kadar setiap harinya (Meng *et al.*, 2015).

Proses pembentukan osteosit (sel osteoblas melepaskan matriks mineralisasi sehingga terjadi diferensiasi) pada proses kultur sel MSC dapat diamati setelah proses kultur dalam medium yang bersifat osteogenik selama 21-40 hari (Cirano *et al.*, 2015). Pengamatan dapat dilakukan melalui pengukuran kadar *COL1a1*, *OCN* (osteokalsin) sebagai matriks ekstraselular tulang untuk mengetahui terjadinya proses kepadatan tulang secara *in vitro* (Marini *et al.*, 2015). Selain itu, Meng *et al.* (2015) juga menyatakan bahwa pewarnaan alizarin red dapat mendeteksi keberhasilan diferensiasi osteoblas dan pembentukan osteosit. Peneliti lain, yaitu Moon, Kwon dan Yoo (2013), juga memeriksa aktivitas *ALP* (Alkalin Posfat), *RUNX2*, *OPN*, dan *OCN* untuk mengetahui proses diferensiasi osteoblas sel pada permukaan titanium yang berbeda.

Berdasarkan penjelasan diatas, diketahui bahwa material titanium adalah material yang memiliki kemampuan untuk menginduksi terjadinya proliferasi dan diferensiasi beberapa jenis sel MSC, maka pada penelitian ini diharapkan dengan melakukan pelapisan kolagen pada material jenis baru tipe β titanium (TNTZ) dapat memicu proses diferensiasi sel WJ-MSK lebih cepat dan dapat dikarakterisasi proses diferensiasi tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang, dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Apakah ada pengaruh implan TNTZ dilapisi kolagen terhadap ekspresi gen *BMP2*, *RUNX2*, dan *IBSP* selama proses pembentukan osteosit pada sel WJ-MSC?
2. Apakah ada pengaruh implan TNTZ dilapisi kolagen terhadap nilai pembentukan osteosit pada sel WJ-MSC?
3. Apakah ada pengaruh implan TNTZ dilapisi kolagen terhadap proses pembentukan osteosit melalui peningkatan kadar ekspresi gen *BMP2* sel WJ-MSC?
4. Apakah ada pengaruh implan TNTZ dilapisi kolagen terhadap proses pembentukan osteosit melalui peningkatan kadar ekspresi gen *RUNX2* sel WJ-MSC?
5. Apakah ada pengaruh implan TNTZ dilapisi kolagen terhadap proses pembentukan osteosit melalui peningkatan kadar ekspresi gen *IBSP* sel WJ-MSC?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh implan TNTZ dilapisi kolagen terhadap pembentukan osteosit melalui ekspresi *BMP2*, *RUNX2*, dan *IBSP* secara *in vitro* pada sel *Wharton's Jelly Stem Cells* (WJ-MSC)

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh implan TNTZ dilapisi kolagen terhadap ekspresi gen *BMP2*, *RUNX2*, dan *IBSP* selama proses pembentukan osteosit pada sel WJ-MSC.

2. Mengetahui adanya pengaruh implan TNTZ dilapisi kolagen terhadap nilai pembentukan osteosit pada sel WJ-MSC.
3. Mengetahui ada pengaruh implan TNTZ dilapisi kolagen terhadap proses pembentukan osteosit melalui peningkatan kadar ekspresi gen *BMP2* sel WJ-MSC.
4. Mengetahui ada pengaruh implan TNTZ dilapisi kolagen terhadap proses pembentukan osteosit melalui peningkatan kadar ekspresi gen *RUNX2* sel WJ-MSC.
5. Mengetahui ada pengaruh implan TNTZ dilapisi kolagen terhadap proses pembentukan osteosit melalui peningkatan kadar ekspresi gen *IBSP* sel WJ-MSC.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Bagi Ilmu Pengetahuan

Penelitian ini diharapkan dapat menambah khazanah ilmu pengetahuan mengenai respon biologis implantasi titanium dilapisi dengan kolagen terhadap jaringan tulang khususnya dalam aplikasi biomedis. Informasi penelitian ini juga dapat digunakan untuk pengembangan pemanfaatan biomaterial.

2. Bagi praktisi

Penggunaan TNTZ dilapisi kolagen yang bioaktif sebagai salah satu alternatif implan yang dapat meningkatkan proses diferensiasi sel dan nilai osseointegrasi sebagai material fiksasi temporal maupun permanen sehingga mempercepat proses penyembuhan dan bertahan lama dalam tubuh tanpa efek samping berlebih.

3. Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang penggunaan implantasi berbasis titanium dan lapisan kolagen sebagai salah

satu bentuk penanganan untuk kerusakan jaringan tulang baik pemasangan secara permanen (artroplasti) maupun temporal.

